

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5021000号
(P5021000)

(45) 発行日 平成24年9月5日(2012.9.5)

(24) 登録日 平成24年6月22日(2012.6.22)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 N 7/00 (2006.01) C 1 2 N 7/00

請求項の数 7 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2009-157882 (P2009-157882)	(73) 特許権者	501453189
(22) 出願日	平成21年7月2日(2009.7.2)		バクスター・ヘルスケア・ソシエテ・ア ノニム
(62) 分割の表示	特願2003-554878 (P2003-554878) の分割		BAXTER HEALTHCARE S . A.
原出願日	平成14年12月10日(2002.12.10)		スイス国 8152 グラットパーク (
(65) 公開番号	特開2009-261410 (P2009-261410A)		オブフィコン), サーガウアーシュトラ ーセ 130
(43) 公開日	平成21年11月12日(2009.11.12)	(74) 代理人	100060368
審査請求日	平成21年7月2日(2009.7.2)		弁理士 赤岡 迪夫
(31) 優先権主張番号	10/006,881	(74) 代理人	100124648
(32) 優先日	平成13年12月10日(2001.12.10)		弁理士 赤岡 和夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス抗原の大規模生成方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) マイクロキャリアに結合させた接着性細胞培養物を提供する工程、
 (b) 該細胞培養物をコンフルエンスまで増殖させる工程、
 (c) 該細胞にウイルスを感染させる工程、および
 (d) 該ウイルスに感染させた該細胞培養物をインキュベートして該ウイルスを増殖させる工程、を含んでいるウイルスまたはウイルス抗原の生産方法であって；

工程(b)のコンフルエンスまで増殖させた該細胞培養物の培養培地容積を(i)工程(c)の前か、または(ii)工程(c)の後に減らし、バイオマスの細胞密度を少なくとも1.3倍に増加させると共に、培養培地の容積を工程(d)の間再び増加させないことを特徴とする前記方法。

【請求項2】

コンフルエンスまで増殖させた細胞培養物の細胞密度が 0.6×10^6 と 7.0×10^6 細胞/mlの間である請求項1の方法。

【請求項3】

前記マイクロキャリアは、デキストラン、コラーゲン、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ゼラチン、ガラス、セルロース、ポリエチレンおよびプラスチック製のマイクロキャリアよりなる群から選ばれる請求項1または2の方法。

【請求項4】

工程(a)の細胞培養物中のマイクロキャリア濃度が 0.5 g/l と 1.4 g/l の間に

10

20

ある請求項 1 ないし 3 のいずれかの方法。

【請求項 5】

前記細胞が、VERO, BHK, CHO, RK, RK44, RK13, MRC-5, MDCk, CEF および二倍体単層細胞の接着性細胞よりなる群から選ばれる請求項 1 ないし 4 のいずれかの方法。

【請求項 6】

マイクロキャリアに結合させた前記細胞を無血清培地中で増殖させる請求項 1 ないし 5 のいずれかの方法。

【請求項 7】

マイクロキャリアに結合させた前記細胞を無血清無タンパク培地中で増殖させる請求項 1 ないし 6 のいずれかの方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、マイクロキャリアに結合された接着細胞培養物において、ウイルス抗原を生成する改良方法に関する。この方法は、培養培地の容積当たりのウイルス抗原収量の増加を提供する。本発明はまた、個々のコンフルエントな細胞培養物と比較して増加した細胞密度およびマイクロキャリア濃度を有する、接着細胞の細胞培養物バイオマスに関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

効率的なワクチン生成には、宿主系から高収量で生成される大規模量のウイルスの増殖が必要とされる。ウイルス株が増殖される培養条件は、その株の許容できる高収量を達成することに関して、非常に重要である。従って、望ましいウイルスの収量を最大にするために、その系および培養条件の両方が、その望ましいウイルスの生成のために有利である環境を提供するために特に適合されなければならない。従って、種々のウイルス株の許容できる高収量を達成するために、多数の種々のウイルスについて最適の増殖条件を提供する系が、必要とされる。

【0003】

経済的に価値のある唯一のプロセスは、リアクタープロセスである。なぜなら、スケールアップが、市場サイズおよび必要なワクチン用量にとって適切にされ得るからである。接着細胞について、古典的マイクロキャリアを用いるキャリアプロセスが、ウイルス増殖のために必要とされる細胞の大規模培養のための現在最良の選択肢である (Van Wezelら、1967、Nature 216:64~65; Van Wezelら、1978、Process Biochem. 3:6~8)。マイクロキャリアにおけるポリオウイルス、A型肝炎ウイルス、HSV、またはマレック病ウイルスの大規模プロセス生成が、記載されている (米国特許第4,525,349号; Widelら、1984、J. Virological Meth. 8:63~71; Fiorentineら、1985、Develop. Biol. Standard 60:421~430; Griffithsら、1982、Develop. Biol. Standard. 50:103~110)。マイクロキャリア培養物に基づく現在のプロセスによって、1200lまでの発酵槽サイズを使用するウイルス生成が可能である。

【0004】

Caijら (1989、Arch. Virol. 105:113~118) は、マイクロキャリア培養物および従来の単層培養物におけるブタコレラウイルスのウイルス力価の生成収量を比較した。彼らは、マイクロキャリアシステムを使用して、より高い培地容積当たりのウイルス収量が得られ得ることを見出した。

【0005】

Griffithsら (1982、Develop. Biol. Standard. 50:103~110) は、

10

20

30

40

50

50:103~110)は、細胞増殖およびHSV生成に対するマイクロキャリア濃度の影響を研究した。最適なマイクロキャリア濃度が、高細胞密度に達するためには必要であり、この最適なマイクロキャリア濃度はまた、得られるウイルス収量にも影響することが、見出された。しかし、還流システムにおけるより高いマイクロキャリア濃度は、ビーズを脱却する細胞層に起因して、細胞の損失をもたらした。

【0006】

マイクロキャリアシステムにおけるウイルス生成プロセスの生産性は、ウイルス、細胞、マイクロキャリアの型、およびそのシステムにおいて得られる細胞密度に依存する。細胞培養物中のより高いマイクロキャリア濃度は、より高い総細胞数を可能にする。しかし、マイクロキャリアは費用がかかり、これらの条件において、このシステムにおける剪断力によりビーズを脱却する細胞層に起因して、細胞の損失が生じ得る。このことは、より高いウイルス収量のために、大容積のマイクロキャリア細胞培養物が必要とされることを意味するが、これは、そのような大容積の処理および精製のためになされる必要がある努力を増加させる。

10

【0007】

ウイルス増殖について、最大ウイルス収量を得るために、最適細胞密度が達成されることが重要である。細胞へのウイルスの効率的吸着を可能にすることもまた、重要である。従って、従来の方針において、増殖培地の容積は、最低限の培養容積において細胞へのウイルスの吸着を可能にするため、およびより良好なウイルス対細胞比のために、感染前に減少される。しかし、最適なウイルス増殖を得るために、培養培地容積は、細胞に生存および/または増殖を維持させるための適切な吸着時間の後に、再び増加される。しかし、このことは、細胞および/またはウイルスを含む培養培地容積を増加させ、このことは、細胞または細胞培養培地からウイルスをさらに精製するために大容積が処理されなければならないという不利点を有する。

20

【0008】

ウイルス感染の発生の場合、大量のワクチンを、時宜を得た様式で生成して、非常に短期間のうちに数百万ワクチン用量を提供することが、重要である。従って、ウイルスおよび抗原を生成するための安全かつ有効な方法について、継続している必要性が存在する。さらに、すでに利用可能な材料を使用し、最少数の時間がかかる操作(例えば、減少した細胞培養培地容積の取扱い、ワクチン生成のための精製および下流プロセスの促進)しか必要としない、ウイルス増殖に対するアプローチについての必要性が存在する。

30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の簡単な要約)

マイクロキャリアに結合された接着細胞の細胞培養物において、ウイルスまたはウイルス抗原を生成するための方法を提供することが、本発明の目的である。

【0010】

小さい細胞培養物容積にてウイルスを生成する方法を提供することもまた、本発明の目的である。

40

【0011】

コンフルエンスまで増殖させたもとの細胞培養物と比較して高い細胞密度を有する接着細胞の細胞培養物を提供することもまた、本発明の目的である。

【0012】

マイクロキャリアに結合された接着細胞の細胞培養物であって、コンフルエンスまで増殖させたもとの細胞培養物と比較して高い細胞密度を有する接着細胞の細胞培養物を提供することが、本発明の目的であり、これらの細胞はウイルスに感染している。

【0013】

(発明の詳細な説明)

これらの目的および他の目的に従って、本発明は、ウイルスまたはウイルス抗原の生成

50

のための方法を提供し、この方法は、マイクロキャリアに結合された接着細胞培養物を提供する工程、その細胞培養物をコンフルエンスまで増殖させる工程、その細胞にウイルスを感染させる工程、ならびにそのウイルスに感染した該細胞培養物をインキュベートしてそのウイルスを増殖させる工程、を包含し、この細胞培養物の細胞密度は、(i)ウイルス感染の前または(ii)ウイルス感染の後に増加される。この細胞培養物中の細胞密度の増加は、その細胞培養物の濃度によりなされ、この増加は、その細胞培養物中のマイクロキャリア濃度の増加を含む。

【0014】

一般に、マイクロキャリアに結合された接着細胞は、高細胞密度に達するために最適なマイクロキャリア濃度対細胞比を必要とする。この細胞培養物中のマイクロキャリア濃度の増加は、理論上は、培養培地容積当たりのより高い細胞密度に達するのを可能にする。しかし、マイクロキャリア濃度の増加による剪断効果、その培地における給餌源の減少および細胞の生理的ストレスに起因して、細胞培養システムにおけるキャリア濃度は、特定の濃度に制限される(Griffithsら、1982(上記)をまた参照のこと)。

10

【0015】

本発明の方法は、最適増殖条件(マイクロキャリア濃度、供給、および最少の生理的ストレスを含む)下で細胞を増殖させて、使用したシステムについて最大の細胞密度に達することを可能にする。

【0016】

本発明において、ウイルス感染の前または後の培養培地容積の減少により、細胞培養物バイオマスにおける細胞密度およびマイクロキャリア濃度が増加し、そのことは、細胞の生産性に影響しないことが、見出される。対照的に、1細胞につき得られるウイルス収量が、もとのコンフルエントな細胞培養物と同じ細胞密度で維持される細胞と比較して増加され得ることもまた、驚くべきことに見出される。このことは、非常に予想外であった。なぜなら、細胞培養物中のマイクロキャリア濃度の増加に起因して、細胞生存の減少、マイクロキャリアからの細胞の脱却およびウイルス生成の間のより高い細胞密度に起因する生理的ストレスが、予測されていたからである。

20

【0017】

本発明の方法は、さらなるウイルス精製プロセスの間に処理されなければならない培養培地容積を減少することを可能にすると同時に、1細胞当たりのウイルス生産性は元の細胞培養物と比較して同様であるかまたは増加さえされる。このシステムは、60001発酵槽容積までスケールアップされ得、これにより、ワクチンのためのウイルス生成プロセスが、より効率的かつ時間を食うものになる。

30

【0018】

本方法の一実施形態によると、足場依存性細胞は、Reuvenyら(1985, Develop. Biol. Standard, 60: 243~253)により記載されるようなVERO接着細胞、BHK接着細胞、CHO接着細胞、RK接着細胞、RK44接着細胞、RK13接着細胞、MRC-5接着細胞、MDCK接着細胞、CEF接着細胞、または二倍体単層細胞接着細胞、および当該分野で周知の他の接着細胞からなる群より選択される。

40

【0019】

マイクロキャリアに結合された接着細胞が、血清を含む従来の培養培地において増殖され得る。本発明の好ましい実施形態によると、その細胞は、Kistnerら(1998, Vaccine, 16: 960~968)、Mertenら(1994, Cytotech, 14: 47~59)、Cinatlら(1993, Cell Biology Internat, 17: 885~895)、Kesslerら(1999, Dev. Biol. Stand, 98: 13~21)、WO 96/15231、米国特許第6,100,061号により記載される無血清培地または無血清無タンパク質培地、または当該分野で公知の他の任意の無血清培地または無血清無タンパク質培地において、増殖される。その細胞は、好ましくは、無血清培地または無血清無タンパク質培地においてアンプルか

50

ら大規模へバイオマスへと増殖される。

【0020】

本発明の一実施形態によると、マイクロキャリアに結合された接着細胞の培養物が、コンフルエンスまで増殖され、そしてそのコンフルエントな細胞培養物の細胞バイオマスの細胞密度およびマイクロキャリア濃度が増加した後、ウイルス感染される。

【0021】

本発明の一実施形態によると、マイクロキャリアに結合された接着細胞の培養物が、コンフルエンスまで増殖され、そしてそのコンフルエントなバイオマスの細胞密度およびマイクロキャリア濃度が増加する前に、ウイルス感染される。ウイルス感染が細胞密度およびマイクロキャリア濃度の増加前または増加後に行われるどちらの場合でも、高められた細胞密度およびマイクロキャリア濃度を有する細胞培養物の細胞密度およびマイクロキャリア濃度は、ウイルス増殖およびウイルス生産プロセスの間一定に維持され、細胞培養物の培地の容積は再び増加されない。ウイルスに感染していないかまたはウイルスに感染しているかのいずれかである細胞培養物バイオマス中の細胞密度およびマイクロキャリア濃度を増加させるために使用される方法は、細胞培養物を濃縮するために当該分野で公知の任意の方法であり得る。これは、例えば、沈降、遠心分離、濾過、還流デバイスを用いる濃縮、作業容積の減少を可能にする篩などの方法によってか、または2つ以上のバイオリアクターシステムをプールすることによって、行われ得る。

10

【0022】

コンフルエンスまで増殖された細胞培養物の細胞培養物密度およびマイクロキャリア濃度は増加され、その増加は、コンフルエンスまで増殖された元のバイオマスと比較して少なくとも1.3倍であるべきである。コンフルエンスまで増殖した元の出発細胞培養物の細胞密度は、約 0.6×10^6 細胞/mlと約 7.0×10^6 細胞/mlとの間にあり得る。この場合、その出発培養物バイオマスと比較して増加した細胞密度を有するバイオマスは、少なくとも 0.8×10^6 細胞/mlと少なくとも 9.0×10^6 細胞/mlとの間の細胞密度を有し得る。

20

【0023】

その出発細胞培養物中のマイクロキャリア濃度は、好ましくは、約 0.5 g/l ～約 7.0 g/l の範囲にある。コンフルエントなバイオマスの濃縮後のマイクロキャリア濃度は、好ましくは、約 0.65 g/l ～約 21 g/l の範囲にある。

30

【0024】

本発明の方法により使用されるマイクロキャリアは、好ましくは、デキストランに基づくマイクロキャリア、コラーゲンに基づくマイクロキャリア、ポリスチレンに基づくマイクロキャリア、ポリアクリルアミドに基づくマイクロキャリア、ゼラチンに基づくマイクロキャリア、ガラスに基づくマイクロキャリア、セルロースに基づくマイクロキャリア、ポリエチレンに基づくマイクロキャリア、およびプラスチックに基づくマイクロキャリア、ならびにMillerら(1989, *Advances in Biochem Eng. / Biotech.* 39:73~95)およびButler(1988, *Spier* およびGriffith, *Animal cell Biology* 3:283~303)により記載されるマイクロキャリアからなる群より選択される。

40

【0025】

本発明の方法の一実施形態によると、そのウイルスは、インフルエンザウイルス、ロスカウウイルス、A型肝炎ウイルス、ワクシニアウイルスおよび組換えワクシニアウイルス、単純疱疹ウイルス、日本脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルスおよびそのキメラ、ならびにライノウイルスおよびレオウイルスからなる群より選択される。接着宿主細胞およびこの宿主に対して感受性であるウイルスを選択すること、ならびに望ましいウイルスのウイルス収量の増加を得るための本発明の方法を使用することは、当業者の知識の範囲内にある。

【0026】

個々のマイクロキャリアの型、出発培養物中のマイクロキャリア濃度、ウイルスに対し

50

て感受性である接着細胞、ならびに培地条件および最適増殖条件（酸素濃度、培地の補充物、温度、pH、圧力、攪拌速度、および供給制御など）を、この方法により細胞密度およびマイクロキャリア濃度の増加を有する細胞バイオマスを得るために使用され得るコンフルエントな細胞培養物バイオマスを得るために選択することは、当業者の知識の範囲内にある。より高い細胞密度を抽出得る細胞培養物は、その後、有効なウイルス増殖およびウイルス生成のために使用され得る。細胞培養物がコンフルエントに達した後、本発明の方法は、少なくとも1.3倍～10倍までのマイクロキャリア濃度の細胞密度の増加を有する細胞培養物を得ること、および培養物容積当たりのより高いウイルス収量を得ることを可能にし、このことは、i)減少した培養物容積、およびii)増加した1細胞当たりの生産性に起因する。

10

【0027】

ウイルス生成プロセスおよび生成のためのタイムスパンは、使用されるシステムに依存する。個々の系において到達可能な最大ウイルス収量は、標準的方法により決定され得る。最大ウイルス生成収量に到達した場合、そのウイルスおよび/またはそのウイルスを含む細胞が、採集される。従って、本発明の方法は、増殖されそして生成されたウイルスを採集する工程をさらに包含する。

【0028】

本発明の別の局面は、精製ウイルスまたは精製ウイルス抗原の生成のための方法を提供し、この方法は、マイクロキャリアに結合された接着細胞培養物を提供する工程、その細胞培養物をコンフルエンスまで増殖させる工程、その細胞培養物にウイルスを感染させる工程、そのウイルスに感染した該細胞培養物をインキュベートしてそのウイルスを増殖させる工程、(f)生成したウイルスを採集する工程、および(g)この採集したウイルスを精製する工程、を包含し、この細胞培養物中の細胞密度は、(i)ウイルス感染の前または(ii)ウイルス感染の後に増加される。

20

【0029】

感染および増殖のために使用されるウイルスの性質に依存して、生成されるウイルスは、細胞培養物の上清において見出されるか、そして/または細胞バイオマスに付随しているかのいずれかである。溶菌ウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）は、感染後の適切な時間の後、その細胞を溶解し、そしてそのウイルスは、細胞培養培地中に放出される。細胞培養培地において生成され放出されるウイルスは、従来の方法（例えば、遠心分子（超遠心分離、密度勾配遠心分離を含む）、微細濾過、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィーなど）により、細胞バイオマスまたは他の細胞断片から分離され得、そして精製され得る。

30

【0030】

非溶菌ウイルスは、細胞中で増殖し、そして依然としてそのバイオマスの細胞に付随する。これらのウイルスは、そのバイオマスを収集し、その細胞を従来の方法により処理すること（例えば、その細胞を、界面活性剤、熱、凍結/融解、超音波処理、フレンチプレス、または他の細胞溶解法で処理すること）によって溶解することによって、採集され得る。この細胞から放出されたウイルスは、採集され、濃縮され、そして精製される。このウイルスの精製は、当該分野で公知の任意の方法（例えば、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、または等密度遠心分離など）により行われ得る。

40

【0031】

インフルエンザウイルスは、細胞株（最も効率的なMDC K細胞、ならびにヒトワクチンの製造における使用について承認されている細胞株、Ver o細胞を含む）において増殖され得る。バイオリクター中のマイクロキャリアピース上の哺乳動物細胞培養物における、無血清培地または無血清無タンパク質培地におけるインフルエンザウイルスの大規模生成、およびインフルエンザウイルスワクチンの開発は、記載されている（Mert enら、1999、Dev . Biol . Stand . 98 : 23 ~ 37 ; Kistner ら、1998、Vaccine 16 : 960 ~ 968 ; Kistner ら、1999、Dev . Biol . Stand . 98 : 101 ~ 110およびWO 96 / 15231）。

50

【0032】

一局面によると、本発明は、インフルエンザウイルスの生成のための方法を提供し、この方法は、マイクロキャリアに結合された接着細胞培養物を提供する工程、その細胞培養物をコンフルエンスまで増殖させる工程、その細胞にインフルエンザウイルスを感染させる工程、ならびにそのインフルエンザウイルスに感染したその細胞培養物をインキュベートしてそのウイルスを増殖させる工程、を包含し、この細胞培養物中の細胞密度は、(i)このウイルス感染の前または(ii)ウイルス感染の後に増加される。インフルエンザウイルスに感染される細胞は、VERO細胞もしくはMDC K細胞、またはインフルエンザウイルスに対して感受性である任意の細胞であり得る。本発明の好ましい実施形態によると、VERO細胞が使用され、そしてインフルエンザウイルスに感染される。好ましい実施形態によると、このVERO細胞は、元のアンプルからバイオマスまで、無血清培地または無血清無タンパク質培地において増殖される。マイクロキャリアに結合されたVERO細胞は、個々の培地においてコンフルエンスまで増殖され、そして細胞密度およびマイクロキャリア濃度は、少なくとも1.3倍増加される。この細胞は、培養物容積の細胞密度増加の前または後のいずれかに、インフルエンザウイルスにより感染され得る。感染した高細胞密度バイオマスのインキュベーションおよびウイルス生成の後に、生成されたインフルエンザウイルスまたはインフルエンザウイルス抗原が、採集される。採集されたウイルスは、当該分野で公知の方法(例えば、Kistnerら、1998(上記)または米国特許6,048,537号に記載される方法)によって、さらに精製される。

10

【0033】

本発明の別の局面は、高細胞密度を有するマイクロキャリアに結合された接着細胞の細胞培養物バイオマスを提供し、この細胞培養物中の細胞バイオマスの細胞密度は、コンフルエンスまで増殖された細胞培養物と比較して、少なくとも1.3倍である。マイクロキャリアに結合された接着細胞の培養物は、VERO足場依存性細胞、BHK足場依存性細胞、CHO足場依存性細胞、RK足場依存性細胞、RK44足場依存性細胞、RK13足場依存性細胞、MRC-5足場依存性細胞、MDC K足場依存性細胞、CEF足場依存性細胞、または二倍体単層細胞足場依存性細胞からなる群より選択される細胞である。高細胞密度を有する細胞培養物バイオマスは、好ましくは、VERO細胞培養物である。

20

【0034】

本発明の好ましい実施形態によると、この細胞培養物バイオマスは、無血清培地において増殖され、血清に由来するいかなる物質も因子も含まない。別の好ましい実施形態によると、このバイオマスは、無血清無タンパク質であり、培地に添加されるいかなる血清由来物質も血清由来タンパク質も含まない。好ましくは、この細胞は、元のアンプルからバイオマスまで、無血清培地または無血清無タンパク質培地において増殖された。高細胞密度を有するバイオマスは、ウイルス増殖プロセスおよびウイルス生成プロセスの間、無血清培地または無血清無タンパク質培地において維持される。

30

【0035】

本発明の別の実施形態によると、コンフルエンスまで増殖された細胞培養物と比較して高い細胞密度を有するバイオマスの細胞が、ウイルスに感染される。ウイルスに感染した高細胞密度バイオマスの培養培地の細胞密度および容積は、ウイルス増殖プロセスの間維持される。

40

【0036】

本発明の別の局面は、マイクロキャリアに結合されたVERO細胞の細胞培養物バイオマスを提供し、その細胞培養物中のVERO細胞のバイオマスおよび細胞密度は、コンフルエンスまで増殖されたVERO細胞培養物と比較して、少なくとも1.3倍である。この細胞培養物はまた、コンフルエンスまで増殖された細胞と比較して高いマイクロキャリア濃度を有する。

【0037】

本発明の好ましい実施形態によると、より高い細胞密度を有する細胞培養物バイオマスは、VERO細胞のバイオマスである。好ましくは、この細胞は、無血清培地において増

50

殖され、このバイオマスは、無血清である。本発明の別の好ましい実施形態によると、このバイオマス培養物は、無血清無タンパク質である。

【0038】

本発明の別の局面は、ウイルスに感染したマイクロキャリアに結合された接着細胞の細胞培養物の細胞培養物バイオマスを提供し、この細胞培養物中の感染した細胞のバイオマスは、コンフルエンスまで増殖した感染前の細胞培養物と比較して、少なくとも約1.3倍であり、より高い細胞密度を有する。一実施形態によると、細胞の細胞培養物バイオマスは、無血清である。本発明の別の好ましい実施形態によると、その細胞培養物バイオマスは、無血清無タンパク質である。その細胞は、好ましくはVERO細胞である。ウイルスに感染した高細胞密度バイオマスの細胞密度は、ウイルス増殖プロセスの間に減少されない。

10

【0039】

本発明の別の局面は、マイクロキャリアに結合されておりかつマイクロキャリアに結合された高い細胞密度を有する、VERO細胞の細胞培養物バイオマスを提供し、この細胞培養物中のVERO細胞のバイオマスは、コンフルエンスまで増殖されたVERO細胞培養物と比較して少なくとも1.3倍であり、このVERO細胞は、ウイルスに感染している。このVERO細胞は、インフルエンザウイルス、ロス川ウイルス、A型肝炎ウイルス、ワクシニアウイルスおよびその組換え誘導体、単純疱疹ウイルス、日本脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルスおよびそのキメラ、ライノウイルス、ならびにレオウイルスからなる群より選択されるウイルスに、感染している。

20

【0040】

別の一局面によると、本発明は、マイクロキャリアに結合しておりかつ高細胞密度を有する、VERO細胞の細胞培養物バイオマスを提供し、この細胞は、インフルエンザウイルスに感染しており、この細胞培養物中のVERO細胞のバイオマスは、コンフルエンスまで増殖されたVERO細胞培養物と比較して、少なくとも1.3倍である。

【0041】

別の一局面によると、本発明は、マイクロキャリアに結合しておりかつ高細胞密度を有する、VERO細胞の細胞培養物バイオマスを提供し、この細胞は、ロス川ウイルスに感染しており、この細胞培養物中のVERO細胞のバイオマスは、コンフルエンスまで増殖されたVERO細胞培養物と比較して、少なくとも1.3倍である。

30

【0042】

別の一局面によると、本発明は、マイクロキャリアに結合しておりかつ高細胞密度を有する、VERO細胞の細胞培養物バイオマスを提供し、この細胞は、A型肝炎ウイルスに感染しており、この細胞培養物中のVERO細胞のバイオマスは、コンフルエンスまで増殖されたVERO細胞培養物と比較して、少なくとも1.3倍である。

【0043】

ここで本発明を一般的に記載してきたが、本発明は、以下の実施例を参照することによって理解される。これらの実施例は、例示のみのために本明細書中に提供され、他のように特定されない限りは、限定するものであることは意図されない。

【実施例】

40

【0044】

(実施例1)

(濃縮Ver o細胞バイオマスにおけるウイルス抗原生成)

(a)細胞培養物の増殖)

VERO細胞(アフリカミドリザル、Cercopithecus aethiops、腎臓)を産生細胞株として使用した。この細胞を、ATCC CCL 81の名称の下、継代数124で、American Type Cell Culture Collection、Rockville、Marylandから得た。この細胞を、Kistnerら、1998(上記)、WO96/15231または米国特許第6,100,061号に記載されるような無血清培地または無血清無タンパク質培地中で増殖するように適

50

合させた。無血清培地中での増殖のために、無機塩、アミノ酸、重炭酸ナトリウム (2 g / l) および酵母抽出物または大豆抽出物 (0.1 ~ 1.0 g / l) を補充した、基本 DMEM HAM's F12 培地を、使用する。作業細胞バンクを、いかなる動物由来の培地成分も使用することなく調製した。

【0045】

作業細胞バンクの細胞を、分割比 1 : 6 または 1 : 8 にて T 型フラスコおよびローラーボトルにおいて増殖させた。その細胞のさらなる増殖を、接着基材として Cytodex (登録商標) を使用して、100 l 攪拌タンクバイオリアクターにて実施した。この細胞を、37 °C にて 6 日間 ~ 8 日間増殖させた。酸素飽和 20 % ± 10 % および pH 7.25 ± 0.35 の培養条件を、一定に維持した。バイオマス生成の最後に、細胞がコンフルエンス増殖に達した場合、そのバイオマスリアクター容積の一部を、沈降によって 2 倍に濃縮し、未濃縮細胞培養物および濃縮細胞培養物の細胞密度を決定した。

10

【0046】

(b) バイオマスの細胞密度の決定)

バイオマス生成の終わりの細胞培養物のバイオマスの細胞数を、Scharf ら (1988. Biotechnologie in Labor Praxis 10:1096 ~ 1103) により記載されるように、その細胞をトリプシン処理し、CASY (登録商標) 細胞計数器を用いて計数すること (方法 A)、または Sanford ら (1951. J. Natl. Cancer Inst. 11:773 ~ 795) により記載されるように、クエン酸およびクリスタルバイオレット処理した後、血球計を用いて係数すること (方法 B) のいずれかによって、決定した。バイオマス生成の終わりの Vero 細胞についての細胞密度およびキャリア濃度、ならびにコンフルエントバイオマスの濃縮後 (感染前) の Vero 細胞についての細胞密度およびキャリア濃度を、方法 A および方法 B によって計算した。データを表 1 に示す。

20

【0047】

(表 1)

(バイオマス生成の終わりのコンフルエント細胞培養物中の細胞数、およびコンフルエント細胞培養物の濃縮後の細胞数の決定)

【0048】

【表 1】

30

	バイオマス生成	濃縮バイオマス
キャリア濃度 g/l	5.0	10.0
細胞密度 細胞/ml (方法 A)	4.6×10^6	9.2×10^6
細胞密度 細胞/ml (方法 B)	5.6×10^6	11.2×10^6

40

(実施例 2)

(コンフルエントバイオマスと濃縮したコンフルエントバイオマスとの、ウイルス抗原生成の比較)

規定した継代数の Vero 細胞を、液体窒素から融解し、そしてルー (roux) およびローラーボトルに通して、1.5 リットルバイオリアクターに接種するために十分な細胞を生成した。最終細胞密度 1.5×10^6 細胞/ml のコンフルエンスに達した後、その細胞をトリプシン処理し、10 リットルバイオリアクターに移した。その後、これを、マイクロキャリア濃度 1.5 g / l を有する 100 リットルバイオリアクターへの接種物として使用する。 10^7 細胞を含む作業細胞バンクアンプルから出発して、約 30 世代が、最終コンフルエント Vero 細胞バイオマスに達するために必要とされる。この培養

50

物を、最終細胞密度 $1.9 \times 10^6 / ml$ のコンフルエンシーに達するように増殖させた。ウイルス感染の前に、2つの10リットルバイオリクターシステムに、異なる総細胞数を有する細胞培養物バイオマスを充填した。発酵槽Aに、 1.9×10^{10} 細胞を充填し、発酵槽Bに、合計細胞数 3.8×10^{10} を充填する。発酵槽Bに充填するためのより高いバイオマス濃度およびキャリア濃度を達成するために、コンフルエンシーまで増殖させた細胞培養物を、このバイオマスを2倍濃縮に達するように沈降することによって濃縮した。発酵槽Aは、コンフルエンシーまで増殖させた元の細胞培養物の100%の細胞バイオマスを含み、発酵槽Bは、コンフルエンシーまで増殖させた元の細胞培養物の200%のバイオマスを含む。

【0049】

10

(a) インフルエンザウイルスの生成)

発酵槽Aおよび発酵槽Bにおける細胞培養物に、インフルエンザウイルス株 H3N2A / Sydney / 5 / 97 を、感染多重度 0.01 にて感染させた。同一のプロセスパラメーターである $32^\circ C$ 、 pO_2 20% および pH 7.1 を適用した。ウイルス増殖のためにインフルエンザウイルスを活性化するために、プロテアーゼ (例えば、トリプシン、プロナーゼ、またはそのトリプシン様部分) を添加した。

【0050】

異なるバイオマス濃度を含む発酵槽Aおよび発酵槽Bの2つの異なる細胞培養物のウイルス抗原生産性を、決定し、そしてインフルエンザウイルス力価 (HAU/ml) および抗原含量 (密度勾配精製した抗原) に基づいて比較した。そのピーク面積は、感染後3日目の溶菌サイクルの終わりの全抗原濃度に対応する。データを表2に示す。

20

【0051】

(表2)

(コンフルエントVERO細胞培養物および濃縮したコンフルエントVERO細胞バイオマスにおける、インフルエンザウイルス力価および抗原の決定)

【0052】

【表2】

発酵槽	A	B
キャリア濃度	1.5 g/l	3.0 g/l
細胞密度 細胞/ml (方法 B)	1.90×10^6	3.80×10^6
HAU / ml	640	2560
ピーク面積 (相対単位)	83,3 (100%)	412,3 (495%)

30

(b) ロス川ウイルスの生成)

VERO細胞を、最終密度 $1.6 \times 10^6 / ml$ のコンフルエンシーに達するように、上記のように増殖させた。ウイルス感染の前に、2つの50リットルバイオリクターシステムに、異なる総細胞数を有する細胞培養物バイオマスを充填した。発酵槽Aに、 1.6×10^6 細胞/mlを充填し、発酵槽Bに、 2.3×10^6 細胞/ml (これは、コンフルエント細胞培養物バイオマスの1.5倍の濃度である) を充填する。発酵槽Aおよび発酵槽Bに、ロス川ウイルスを感染させた。発酵槽Aおよび発酵槽Bのウイルス抗原生産性を、上記のように決定した。表3は、ウイルス増殖のために異なるバイオマス濃度を使用することにより得られたウイルス収率の結果を示す。

40

【0053】

(表3)

(ロス川ウイルス力価および抗原生成の決定)

50

【 0 0 5 4 】

【 表 3 】

発酵槽	A	B
キャリア濃度 g/l	1.5	2.25
細胞密度 ($\times 10^6$ cells/ml)	1.6	2.3
ウイルス力価 (log TCID ₅₀)	8.71	8.95
ウイルス力価 pfu / 10^6 細胞 ($\times 10^6$)	321	388
収率 (%)	100	121

10

(実施例 3)

(R K 細胞の濃縮バイオマスにおけるウイルス抗原生成)

(a) 細胞培養物の増殖)

ウサギ腎細胞 R K - 1 3 または Holzer ら (1 9 9 7 . J . V i r o l . 7 1 : 4 9 9 7 ~ 5 0 0 2) により記載されるその補完誘導株 R K - D 4 R - 4 4 を、生成細胞株として使用した。細胞を、2 % 血清を含む従来の培地において増殖させた。

20

【 0 0 5 5 】

作業細胞バンクからの細胞を、分割比 1 : 6 にて T 型フラスコおよびローラーボトルにおいて増殖させた。その細胞のさらなる増殖を、接着基材として C y t o d e x (登録商標) マイクロキャリアを使用して、1 0 l 攪拌タンクバイオリアクターにて実施した。

【 0 0 5 6 】

(b . 欠損ワクシニアウイルスの生成)

R K - 1 3 細胞または R K - D 4 R - 4 4 細胞が、タンクバイオリアクターにおいてコンフルエンスおよび最終密度に達した後、このバイオマスに、Holzer ら、1 9 9 7 (上記) により記載されるように、ワクシニアウイルス W R または欠損ワクシニアウイルス v D 4 - Z G # 2 を、感染多重度 0 . 0 1 にて感染させた。感染後、2 つの 1 0 リットルバイオリアクターシステムに、異なる総細胞数を有する感染細胞培養物バイオマスを充填した。発酵槽 A に、 $1 . 2 \times 1 0^{10}$ 細胞を充填し、発酵槽 B に、 $2 . 4 \times 1 0^{10}$ 細胞を充填する。発酵槽 B のためにより高いバイオマス濃度およびキャリア濃度を達成するために、コンフルエンスまで増殖させた感染細胞培養物を、より高濃度に達するようにバイオマスを沈降することによって濃縮した。発酵槽 A は、コンフルエンスまで増殖させた元の細胞培養物の 1 0 0 % の細胞バイオマスを含み、発酵槽 B は、コンフルエンスまで増殖させた元の細胞培養物の 2 0 0 % の細胞バイオマスを含む。感染細胞の培地容積当たり異なるバイオマス濃度を含む 2 つの異なる細胞培養物発酵槽 A および発酵槽 B のウイルス抗原生産性を、決定した。その結果を、表 4 にまとめる。

30

【 0 0 5 7 】

(表 4)

(R K 細胞におけるワクシニアウイルス力価の決定)

【 0 0 5 8 】

40

【表 4】

発酵槽	A	B
キャリア濃度 g/l	1.5	2.5
細胞密度 ($\times 10^6$ 細胞/ml)	1.2	2.4
ウイルスカ価 pfu / 10^6 細胞 ($\times 10^6$)	0.8	1.3
収率 (%)	100	162

10

上記実施例は、本発明を例示するために提供され、本発明の範囲を限定するためには提供されない。本発明の他の改変形は、当業者にとって容易に明らかであり、添付の特許請求の範囲によって包含される。本明細書中に引用されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、すべての目的のために参考として本明細書中に援用される。

フロントページの続き

- (72)発明者 ライター, マンフレッド
オーストリア国 アー - 1 1 5 0 ヴィエンナ, ゲブリューダー - ランク - ガッセ 1 1 / 1 7
- (72)発明者 ムント, ヴォルフガング
オーストリア国 アー - 1 0 8 0 ヴィエンナ, フロリアーニガッセ 5 7 / 1 / 2 / 6

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 特表平05 - 5 0 2 5 8 1 (J P , A)
ALTEX, (2001.03), 18, [1], p.50-54
AIDS Res. Hum. Retroviruses, (1989), 5, [2], p.159-172
J. Virol., (2001), 75, [6], p.2653-2659

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8